

Trabajo Fin de Grado

Determinación de compuestos antioxidantes en poblaciones naturales de gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) de la provincia de Huesca

Autor/es

Andrea Toa Sampietro

Director/es

Esther Asensio Casas
Ester Sales Clemente

Escuela Politécnica Superior
2015

Agradecimientos

Esther Asensio Casas y Ester Sales Clemente por su labor como directoras, su profesionalidad, disponibilidad, colaboración y atención a lo largo de todo el proyecto.

A los profesores José Casanova Gascón, Clara Martí Dalmau y Celia Montaner Otín, investigadores del proyecto CTPP6/12, por su colaboración en la recogida del material vegetal empleado en este proyecto.

A José Antonio Manso Alonso, Asunción Callizo Salvo y Belén Aguado Operé por su colaboración y ayuda durante el tiempo que duró la investigación.

A mis padres por su ayuda y apoyo incondicional y su esfuerzo y paciencia durante toda mi vida, porque gracias a vosotros soy quien soy.

Índice

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN.....	- 1 -
1.1. La gayuba, <i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	- 1 -
1.1.1. Caracteres diagnósticos.....	- 1 -
1.1.2. Distribución geográfica.....	- 3 -
1.1.3. Hábitat	- 4 -
1.2. Usos de la gayuba.....	- 5 -
1.3. Caracterización fitoquímica de la gayuba	- 8 -
2. ANTECEDENTES.....	- 13 -
3. OBJETIVOS	- 15 -
4. EXPERIMENTAL	- 17 -
4.1. Material, reactivos y equipos.....	- 17 -
4.2. Material vegetal	- 18 -
4.3. Preparación de los extractos	- 19 -
4.4. Determinación de fenoles totales en extractos de hojas de gayuba.....	- 19 -
4.5. Determinación de arbutina en hojas de gayuba.....	- 21 -
4.5.1. Optimización de la separación e identificación cromatográfica	- 21 -
4.5.2. Preparación de patrones	- 25 -
4.6.- Análisis estadístico	- 26 -
5. RESULTADOS y DISCUSIÓN	- 27 -
5.1. Contenido en fenoles totales y arbutina de las hojas de gayuba recolectadas en primavera	- 27 -
5.2. Contenido en fenoles totales y arbutina de las hojas de gayuba recolectadas en otoño.....	- 29 -
6. CONCLUSIONES.....	- 35 -
7. BIBLIOGRAFÍA.....	- 36 -

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> . Planta completa en floración (A), ramas con frutos (B), detalle del envés de las hojas (C)	-1-
Figura 2. <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> . Detalle de sus flores (A) y frutos (B)	-2-
Figura 3. Caracteres diagnósticos de la especie <i>Arctostaphylos uva ursi</i>	-2-
Figura 4. Distribución en España (A) y Aragón (B) de la gayuba	-3-
Figura 5. Distribución de la gayuba en el Pirineo	-4-
Figura 6. Estructura de la arbutina	-9-
Figura 7. Reacción redox Folin-Ciocalteu	-9-
Figura 8. Localización de las poblaciones de gayuba muestreadas en este estudio.....	-18-
Figura 9. Plantas 7 (izquierda) y 6 (derecha) de <i>Arctostaphylos uva ursi</i> muestreadas en la localidad de Agüero	-19-
Figura 10. Cromatogramas de extractos LI-6 y AN-5 condiciones del Ensayo 1	-22-
Figura 11. Cromatogramas del extracto LI-6 y del punto de calibrado de arbutina en las condiciones del Ensayo 2.....	-23-
Figura 12. Cromatogramas extracto AN-5 a 289, 240 y 220 nm condiciones Ensayo 3 ...	-24-
Figura 13. Cromatograma patrón de 100 µg/g en condiciones del Ensayo 3	-25-
Figura 14. Recta calibrado arbutina en las condiciones cromatográficas optimizadas ...	-25-
Figura 15. Variabilidad encontrada para el contenido en fenoles totales (mg EAG/g PS) y en arbutina (mg/g PS) en los extractos de hojas recolectadas en otoño de ochenta plantas de gayuba	-33-
Figura 16. Variación estacional del contenido de fenoles totales (mg EAG/g PS) (A) y de arbutina (mg/g PS) (B) en las hojas de 24 plantas de gayuba recolectadas en marzo y en septiembre de 2014.....	-34-

Índice de tablas

Tabla 1. Localización, altitud y orientación de las diez poblaciones de gayuba muestreadas en este trabajo.....	-18-
Tabla 2. Curvas de calibración de ácido gálico para determinación de fenoles totales ..	-20-
Tabla 3. Modo gradiente empleado en el Ensayo 1	-21-
Tabla 4. Modo gradiente empleado en el Ensayo 2	-22-
Tabla 5. Modo gradiente empleado en el Ensayo 3	-23-
Tabla 6. Contenido promedio en fenoles totales (mg EAG/g PS) y arbutina (mg/g PS) de las hojas de 24 plantas de gayuba recolectadas en tres poblaciones naturales de la provincia de Huesca en marzo de 2014	-27-
Tabla 7. Fenoles totales (mg EAG/g PS) en hojas de 80 plantas gayuba recolectadas en 10 poblaciones en septiembre. Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no muestran diferencias significativas de acuerdo al test de Tamhane ..	-30-
Tabla 8. Contenido en arbutina (mg/g PS) en hojas de 80 plantas de gayuba recolectadas en 10 poblaciones en septiembre. Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no muestran diferencias significativas de acuerdo al test de Tamhane	-32-

RESUMEN

La gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*) es una Ericácea con distribución circumboreal. En la Península Ibérica crece en los sistemas montañosos del norte y del este, incluidos los aragoneses. El principio activo más relevante (5-15%) es la arbutina (hidroquinona β-D-glucopiranósido), que le confiere sus propiedades antisépticas y anti-inflamatorias, así como su capacidad para inhibir la síntesis de melanina. Las hojas de la gayuba contienen así mismo elevados contenidos de otros compuestos fenólicos, por lo que recientemente se ha propuesto su uso como aditivo antioxidante para las industrias agroalimentaria y cosmética.

En este trabajo hemos estudiado la variabilidad fitoquímica de diez poblaciones de *A. uva-ursi* del norte de Aragón, correspondientes a un amplio rango de altitudes. En concreto se determinaron los contenidos en fenoles totales y en arbutina en hojas de plantas recolectadas en marzo y en septiembre de 2014, durante los dos períodos de crecimiento vegetativo de la especie.

En promedio se obtuvieron mayores niveles de fenoles totales y de arbutina en las hojas recolectadas en septiembre, aunque esto varió en función de la población y de la planta estudiada. Se detectó un amplio rango de variación en los contenidos en compuestos fenólicos de las 80 plantas analizadas, ya que en septiembre mostraron contenidos en fenoles totales que variaron entre $103,3 \pm 4,8$ y $206,4 \pm 6,5$ mg EAG/g PS, y también variaron en su contenido en arbutina entre $92,0 \pm 3,0$ y $194,2 \pm 5,6$ mg/g PS. Las diferencias significativas se observaron entre poblaciones pero sobre todo entre individuos, incluso los de una misma población. Las plantas con mayores contenidos en fenoles totales mostraron también contenidos superiores en arbutina, aunque la correlación observada entre ambas variables fue baja, ya que se estimó un coeficiente de Pearson de 0,326 ($p = 0,003$). La altitud no afectó al contenido en fenoles totales, aunque sí se encontró una baja correlación entre este factor y el contenido en arbutina de las hojas recolectadas en septiembre, con un coeficiente de Pearson de 0,277 ($p = 0,013$).

Palabras clave: altitud, arbutina, ensayo Folin-Ciocalteu, fenoles totales, variación fitoquímica.

ABSTRACT

Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) is a member of the Ericaceae family which is worldwide distributed in Northern regions. It grows in the North and East of the Iberian Peninsula, in mountain ranges, including those in Aragon. Its most important active principle (5-15%) is arbutin (hydroquinone β -D-glucopyranoside), which has antibiotic and anti-inflammatory properties, and also inhibits melanin synthesis. Furthermore, bearberry leaves contain high contents of other phenolic compounds. Therefore, it has recently been proposed as an antioxidant additive useful for the Food and Cosmetic Industries.

In this study we have analysed the phytochemical variation in ten natural populations of *A. uva-ursi* from Northern Aragon, growing in a wide range of altitudes. We determined total phenol and arbutin contents on plant leaves harvested in March and September of 2014, during the two vegetative growth periods of this plant species.

We found higher levels of averaged total phenolic compounds and arbutin on leaves collected in September than on those sampled in March, although this behaviour varied among populations and even among individual plants. We detected a wide range of variation on total phenolic contents, from 103.3 ± 4.8 to 206.4 ± 6.5 GAE mg/g DW, and arbutin content ranged from 92.0 ± 3.0 to 194.2 ± 5.6 mg/g DW. Significant differences were observed among populations but mainly among plants, even among individuals from the same population. Plants showing higher phenolic compounds levels also showed higher arbutin content, although the correlation between both variables was low (Pearson coefficient 0.326, $p = 0.003$). Geographic altitude didn't affect the content in total phenols, but we estimated a low correlation between this factor and the arbutin content of leaves sampled in September (Pearson coefficient 0.277, $p = 0.013$).

Keywords: altitude, arbutin, Folin-Ciocalteau method, phytochemical variation, total phenols.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La gayuba, *Arctostaphylos uva-ursi*

1.1.1. Caracteres diagnósticos

La gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*) es una planta Ericácea subarbustiva, perennifolia, con tallos leñosos rastreros muy ramificados de hasta 1,5 m de altura (Figura 1A). Presenta hojas alternas, coriáceas, obovadas, de enteras y ápice obtuso, con un corto pecíolo (Renobales & Sallés, 2001; Cabeza y Alonso, 2014) que son de color verde oscuro brillante en su cara anterior (Figura 1B) y verde claro en su cara posterior (American Herbal Pharmacopoeia, 2008) con el nervio medio muy bien marcado y los secundarios finamente reticulados (Figura 1C) (Castroviejo & Valdés Bermejo, 1993). Las hojas se mantienen verdes durante todo el invierno (Font Quer, 1999).



Figura 1. *Arctostaphylos uva-ursi*. Planta completa en floración (A), ramas con frutos (B), detalle del envés de las hojas (C). Fuente: commons.wikimedia.org.

Presenta flores en cortos racimos péndulos (2-7 flores), en el extremo de algunas ramas, con corola urceolada, blanca o blanco rosácea, con la base translúcida (Figuras 1A, 2A). El cáliz se compone de cinco lóbulos, pero en este caso de simetría zigomorfa (American Herbal Pharmacopoeia, 2008). Fruto en drupa roja, subgloboso de (5)7-10(14) mm (Figuras 1B, 2B) (Renobales & Sallés, 2001; Cabeza y Alonso, 2014).



Figura 2. *Arctostaphylos uva-ursi*. Detalle de sus flores (A) y frutos (B). Fuente: commons.wikimedia.org.

Las flores de esta especie son hermafroditas, poseen 10 estambres libres que contienen en sus anteras dos apéndices (Renobales & Sallés, 2001) y un ovario unicarpelar y súpero (Castroviejo & Valdés Bermejo, 1993). Únicamente posee un estilo y un estigma capitado (American Herbal Pharmacopoeia, 2008). Dichas flores se encuentran protegidas por dos bractéolas ovadas en la base del pecíolo (Figura 3).



Figura 3. Caracteres diagnósticos especie *Arctostaphylos uva ursi*. Fuente: Flora ibérica.

El ciclo fenológico de la gayuba se compone de dos períodos de crecimiento interrumpidos por una latencia de verano. En el primer periodo la planta comienza a brotar desde finales de abril hasta principios de mayo, y en el segundo el crecimiento tiene lugar entre agosto y septiembre. Se trata de una planta autocompatible, cuyo periodo de floración abarca el principio de primavera, de abril a julio, mientras que su periodo de fructificación está comprendido entre los meses de mayo a septiembre. Su forma biológica es caméfito sufruticoso (Gómez-García, 2005).

Para los seres humanos, las bayas son harinosa y casi sin sabor cuando están crudas, pero bastante aceptables cuando se cocinan (Naczk et al., 2011). En su interior contienen de cinco a siete semillas (American Herbal Pharmacopoeia, 2008). Se reconocen muchas subespecies de *Arctostaphylos uva-ursi* (L.), que se diferencian entre sí por las variaciones en el nivel de ploidía y en su indumento (Packer & Denford, 1974; Wells, 1988; Diggs, 1995).

1.1.2. Distribución geográfica

Arctostaphylos uva-ursi es una especie holártica, se encuentra en norte de Europa, Asia y Norteamérica, mientras que en el sur queda restringida a las áreas montañosas (Renobales & Sallés, 2001; MAGRAMA, Consulta 15/10/2015). Si bien es una especie relativamente abundante, varios países europeos como Alemania, Francia o Bulgaria han adoptado medidas legales de protección con el objetivo de preservar su continuidad debido a la elevada recolección de material silvestre de esta especie (Renobales & Sallés, 2001).

En España, la gayuba se puede encontrar en 28 provincias de la mitad oriental (Figura 4A), abundando en los sistemas montañosos del este de la península y encontrándose de manera más aislada en las áreas montañosas meridionales (Renobales & Sallés, 2001). Puede encontrarse desde el nivel del mar hasta los 1.800 m de altitud.

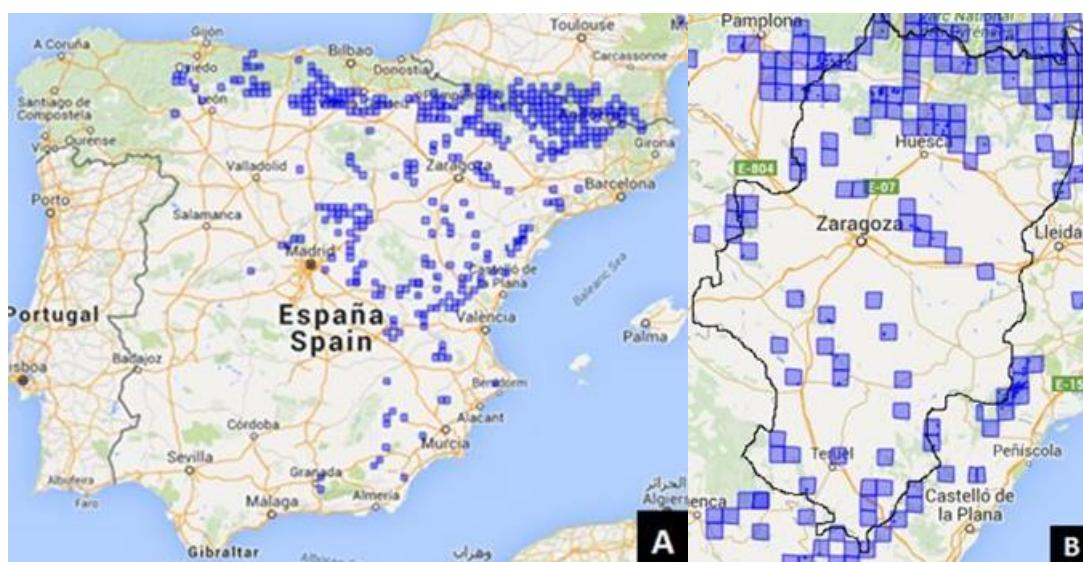


Figura 4. Distribución en España (A) y Aragón (B) de la gayuba (Fuente: SIVIM).

En Aragón (Figura 4B) se encuentra en los Pirineos, en el Sistema Ibérico y en las sierras cercanas a la depresión del Ebro. Aparece entre los 550 m y 2.350 m,

pudiendo encontrarse con menos frecuencia a altitudes inferiores a los 370 m y superiores, hasta 2.500 m (Gómez-García, 2005). Su distribución en el Pirineo es muy común, desde San Julián de Banzo, Costean, El Grado, Estadilla, Aguinaliu y Estopiñán, por el sur, hasta la frontera francesa, tal y como se muestra en la Figura 5 (Alam et al. 2011). Gracia (2007), encontraron en un estudio realizado en el Pirineo que la presencia de la gayuba disminuye con la altitud.



Figura 5. Distribución de la gayuba en el Pirineo (Fuente: Atlas de la Flora de los Pirineos Proyecto POCTEFA).

1.1.3. Hábitat

La gayuba habita bosques aclarados, matorrales, espolones rocosos, crestones o taludes que poseen buena iluminación (Gómez-García, 2005). Se trata de una especie heliófita, exigente de insolación intensa durante todo el año, aunque tolera su ubicación en zonas de sombra, presentando un mejor desarrollo cuando se encuentra en zonas frescas y húmedas (Baudière & Fromard, 1988). Es indiferente a la naturaleza química del sustrato, abunda en calizas y sobre suelos de grava o arena, prefiriendo suelos profundos, permeables y bien drenados (Craighead et al., 1963). Presenta dificultad en desarrollarse sobre texturas arcillosas o limoso-arcillosas, así como en suelos que se encuentran encharcados, temporal o permanentemente (Baudière & Fromard, 1988). Además, puede crecer en suelos pobres nutricionalmente y ajustarse al pH de los mismos; es decir, crece tanto a pH ácido como neutro y básico, ya que posee la habilidad específica de liberar iones H^+ al medio (Craighead et al., 1963). Prefiere climas semisecos como el mediterráneo continental, en el cual las temperaturas son bastante extremas, siendo muy cálidas en verano y muy frías en invierno. En cuanto a la pluviometría, la especie muestra preferencia por zonas cuyas

precipitaciones oscilan entre los 200 y los 500 mm³/año (MAGRAMA, Consulta 15/10/2015).

1.2. Usos de la gayuba

La gayuba se ha utilizado tradicionalmente como alimento para animales y alimentación humana, si bien uno de los usos más importantes que tiene es en el área de la medicina. Sus hojas son utilizadas para bajar la tensión o el colesterol, en infusión para aliviar los síntomas de catarro, para adelgazar, para aliviar el dolor de oídos y muelas o como astringente. Pero el uso más frecuente ha sido para combatir las infecciones de las vías urinarias por su alto contenido en arbutósido (arbutina) y metilarbutósido (derivado metilado de la arbutina), que liberan por hidrólisis hidroquinona, compuesto que es usado para afecciones renales como diurético, antiséptico urinario, en caso de cistitis, contra las piedras de riñón, como analgésico renal o para evitar afecciones de próstata (Cabeza & Alonso, 2014; MAGRAMA, Consulta 15/10/2015). La hidroquinona es metabolizada por el hígado y enviada a los riñones para su excreción, donde actúa como un antiséptico en la vejiga. Desafortunadamente, la hidroquinona también es una toxina hepática, carcinógena e irritante. Por esta razón, la gayuba no se recomienda para el uso en periodos largos de tiempo y en concentraciones altas (Hernández, 2008; Burke et al., 2014).

Los extractos de hojas de gayuba poseen efectos biológicos sobre las bacterias al alterar la hidrofobicidad de la membrana bacteriana, como ocurre en *Escherichia coli* (Türi et al., 1999) y *Helicobacter pylori* (Anuuk et al., 1999), entre otras bacterias. De esta manera se consigue reducir el potencial patógeno de estos microorganismos (Svanberg et al., 1984; Absolom, 1988; Andersson et al., 1998).

En la actualidad, la utilización más frecuente de la gayuba es como blanqueante dérmico en la industria cosmética, ya que inhibe la tirosinasa, enzima que regula la síntesis de melanina (Seo et al., 2012; Amarowicz & Pegg, 2013). *In vitro* se ha estudiado el efecto sobre la síntesis de la melanina del extracto metanolíco de hojas de gayuba y de la arbutina aislada de las mismas, comprobándose que ambos presentan un efecto inhibitorio de la actividad de la tirosinasa.

Se ha propuesto el uso de la gayuba como aditivo antioxidante en la industria agroalimentaria y cosmética, debido a su elevado contenido en compuestos fenólicos. La presencia de anillos aromáticos hidroxilados en la estructura química de estos compuestos les confiere la capacidad para neutralizar radicales libres (acción antioxidante). En los últimos años ha crecido el interés por la utilización de antioxidantes naturales, derivados de vegetales, en sustitución de compuestos de

síntesis (Karre et al., 2013; Shah et al., 2014). Los antioxidantes de origen natural suelen clasificarse en cuatro grandes grupos: ácidos fenólicos (gálico, caféico, rosmarínico), diterpenos fenólicos (carnosol), flavonoides (quercetina y catequina) y aceites volátiles (eugenol, carvacrol, timol, mentol). Derivan de especias como clavo, salvia, romero, tomillo, pimienta, orégano, etc. y también de extractos de té y de vid (Shan et al., 2005). De hecho, los fenoles y polifenoles vegetales son cada vez más empleados como aditivos conservantes en la industria agroalimentaria, en sustitución de productos de síntesis (Brewer, 2011). En un estudio realizado en Canadá, Amarowicz et al. (2004) encontraron en hojas de gayuba niveles de fenoles comparables a los de las hojas de té.

Además de las numerosas investigaciones sobre la aptitud medicinal de la gayuba, existen estudios sobre su valor ecológico, en los que se ha encontrado que esta especie es capaz de colonizar zonas de suelos jóvenes con escasa profundidad, sirviendo como protección frente a la erosión y como fuente de materia orgánica para la formación de suelo. Resulta ser una excelente edificadora del suelo (Gómez-García, 2005), ya que posee un carácter acidificante que permite mejorar sus cualidades tróficas, al favorecer la constitución de un complejo arcilloso-húmico con elevada capacidad de cambio, que se traduce en un notable aumento de la concentración de iones calcio del medio (Baudière & Fromard, 1988). Es así mismo, una planta muy útil para controlar la erosión del suelo en las cuencas y en pendientes profundas, por lo cual es ampliamente utilizada para llevar a cabo la revegetación de cuencas y laderas (Craighead et al., 1963). Ayuda a la regeneración de bosques, ya que mantiene la diversidad de hongos ectomicorrícicos en el suelo durante las deforestaciones (Krpata et al., 2007). Se trata de una especie pionera a la hora de colonizar áreas quemadas y actúa como cortafuegos (Tárrega & Luis, 1992). Esta capacidad de resistencia se debe principalmente al elevado contenido de humedad que posee (Luis et al., 1989). Sin embargo, no es adecuada para usarse en repoblaciones porque impide la regeneración a partir de semillas de otras especies, ya que liberan al entorno una gran variedad de productos primarios y secundarios por las hojas, raíces y restos que caen al suelo, esto se conoce como alelopatía (Taiz & Zeiger, 2006). Estas sustancias producen que la materia muerta que se sitúa bajo la planta constituya un humus ácido de descomposición muy lenta y con una capacidad hidrofílica muy alta, lo que impide que otras especies puedan captar el agua que necesitan para sobrevivir. De igual manera, impide que las semillas que hayan podido subsistir continúen desarrollándose por la alta densidad de cubierta vegetal y enraizamiento (Baudière & Fromard, 1988).

Este arbusto rastrero supone, en cualquier caso, un aporte a la diversidad en el estrato subarbóreo de los bosques de las zonas templadas. En España se han realizado así mismo estudios sobre su capacidad de rebrote tras cortes e incendios (del Barrio et al., 1999; Calvo et al., 2002). La recuperación de la cubierta vegetal puede deberse en parte al rebrote de yemas latentes tras la muerte de la yema principal del tallo y a la plasticidad en el crecimiento horizontal de las ramas, tal como observaron Salemaa et al. (1999) estudiando la tolerancia de la gayuba a la contaminación del suelo por metales pesados.

Arctostaphylos uva-ursi es también empleada como planta ornamental (Badía, 2001), al igual que otros arbustos de la familia de las ericáceas como los brezos (*Erica* spp.), la calluna (*Calluna* spp.) y el madroño (*Arbutus unedo*). Es particularmente interesante como planta tapizante para zonas soleadas y secas en leptosoles. En EEUU se comercializan distintos cultivares seleccionados por su tolerancia a enfermedades y a la sequía y por su vigor.

1.3. Caracterización fitoquímica de la gayuba

Todas las plantas sintetizan fenoles y polifenoles como productos del metabolismo secundario, derivados de la fenilalanina. Se trata de un numeroso grupo de sustancias diferentes, que tienen en común la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Entre los compuestos con un solo anillo aromático se encuentran los ácidos fenólicos, normalmente presentes en las plantas en su forma glicosilada. Los flavonoides (flavonas, isoflavonas, antocianinas, antocianidinas, catequinas, etc.) poseen dos subunidades en su estructura, mientras que entre las sustancias con al menos tres anillos fenólicos se encuentran los taninos. Los mecanismos implicados en la actividad antioxidante de estos compuestos han sido recientemente revisados por Leopoldini et al. (2011).

Los fenoles tienen funciones muy diversas en las plantas, algunas de ellas relacionadas con su interacción con el medio y por tanto su adaptabilidad, como en la defensa contra herbívoros o patógenos, en la atracción de polinizadores y dispersantes de frutos o en la absorción de luz ultravioleta dañina, entre otras (Taiz & Zeiger, 2006). La cantidad de polifenoles que contienen los tejidos vegetales varía tanto en función de factores genéticos como dependiendo de las condiciones ambientales, del momento de la recolección o del ataque de alguna plaga o patógeno. Algunos de esos factores dependen, a su vez, de la altitud (Seigler, 1998). Dado que el material vegetal de gayuba se colecta de poblaciones naturales, resulta de interés el estudio de la influencia de los factores ambientales en el contenido en compuestos fenólicos.

Entre los componentes fenólicos principales de la gayuba se encuentran abundantes taninos gálicos, ácidos fenólicos, triterpenos, iridioides y flavonoides y, como principio activo heterósidos fenólicos, principalmente la arbutina que va acompañada de su derivado metilado, el metilarbutósido (metilarbutina) (Consejo General del Colegio Oficial de Farmacéuticos, CGCOF, 2014). Estudios químicos han demostrado la presencia en la parte aérea de *Arctostaphylos uva-ursi* de diversos grupos de compuestos fenólicos (fenoles simples, glucósidos fenólicos, flavonoides, taninos, procianidinas), triterpenos, polisacáridos, lípidos y aceite esencial. Los distintos compuestos fenólicos se acumulan en cantidades variables en las distintas partes de la planta. En concreto, en las hojas los compuestos fenólicos que predominan son la arbutina, la catequina y la corilagina (Olennikov & Nazarova, 2013).

La sustancia más relevante, debido a su alta concentración en las hojas de gayuba, es la arbutina (hidroquinona β -D-glucopiranósido) (Figura 6), la cual se degrada en el intestino por la acción de enzimas β -glucosidasas, liberando hidroquinona con una importante actividad antimicrobiana cuando se excreta por la orina (Frohne, 1970; Hänsel et al., 1999).

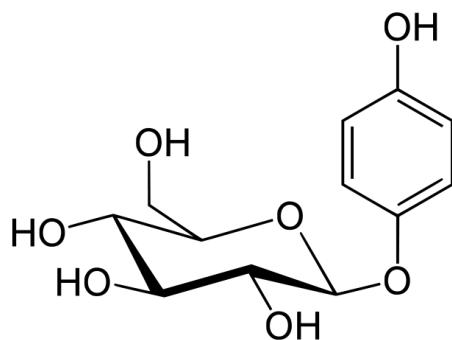


Figura 6. Estructura de la arbutina. Fuente: commons.wikimedia.org.

Para la determinación de compuestos fenólicos, tanto totales como individuales presentes en material vegetal existen diferentes métodos de análisis, los cuales dependen en gran parte de la naturaleza de la matriz de la muestra (hojas, corteza, semillas, etc.) y de las propiedades químicas de los compuestos fenólicos a estudiar, incluyendo la estructura molecular, polaridad, concentración, número de anillos aromáticos y grupos hidroxilo. Para la extracción de compuestos fenólicos de hoja de gayuba los disolventes/extractantes más empleados son el metanol y el etanol, en diferentes proporciones (Dykes et al., 2003; Amarowicz et al., 2004; American Herbal Farmacopeia, 2008; Rychińska & Nowak, 2012).

El método de determinación del contenido en fenoles totales en los extractos de hoja de gayuba más comúnmente empleado se basa en la oxidación de estos

compuestos con el reactivo Folin-Ciocalteu (colorimetría redox). Este reactivo es una mezcla entre wolframato sódico ($\text{Na}_2\text{W}_4\text{O}_9$) y molibdato sódico (Na_2MoO_4) en ácido fosfórico. El ácido fosfomolibdotungstico resultante es de un color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos presentes en la disolución (Jiménez & Girbés, 2012), cambia a una tonalidad azul intensa resultado de una mezcla de óxidos de wolframio y molibdeno (Figura 7).

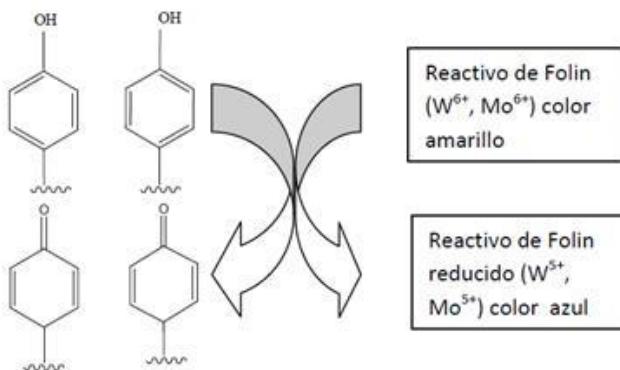


Figura 7. Reacción redox Folin-Ciocalteu. Fuente: (Jimenez & Girbés (2012).

La intensidad de color azul se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 765 nm y los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de muestra (Morillas-Ruiz & Delgado-Alarcón, 2012). La espectrofotometría de absorción molecular en el UV/Vis está basada en la medición de la absorción de radiación ultravioleta/visible por parte de determinadas moléculas. La radiación correspondiente a estas regiones del espectro electromagnético provoca transiciones electrónicas a longitudes de ondas características de la estructura molecular del compuesto que la absorbe (Valladares, 1994).

Por su parte, para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos en distintos tipos de muestras vegetales se puede emplear la cromatografía de líquidos de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) y la electroforesis capilar (EC), siendo más frecuentemente utilizada la cromatografía HPLC (Miaw-Ling & Chur-Min, 2003; Amarowicz et al., 2004; Rychlińska & Nowak, 2012; Khoddami et al., 2013; Panusa et al., 2015).

Parejo et al. (2001) propusieron un método sencillo para la determinación del contenido en arbutina de hojas de gayuba mediante cromatografía HPLC con un detector de fotodiodos en serie (Diode array). Por otro lado, Lamien-Meda et al. (2009) han puesto a punto la determinación de este compuesto mediante cromatografía de gases. Más recientemente, Alam et al. (2011) han desarrollado y validado un método

densiométrico de cuantificación de la arbutina mediante cromatografía de capa fina (High Performance Thin Layer Chromatography, HPTLC).

La American Herbal Pharmacopoeia (2008), recoge un protocolo de análisis mediante cromatografía HPLC estandarizado y validado para la determinación de arbutina en hojas de gayuba, desarrollado a partir de la farmacopea europea. Dicho procedimiento consiste en la separación cromatográfica en una columna de C₁₈ utilizando un gradiente de fase móvil de metanol y agua.

En los preparados comerciales de hojas de gayuba se requiere un contenido mínimo en arbutina del 7% referido a hoja seca, pero en las hojas de las plantas se encuentran niveles muy variables. El contenido en arbutina y metilarbutina presente en las hojas de gayuba varía a lo largo del año entre 5-15%, con un máximo en otoño, y también varía entre poblaciones, con una variación de hasta el 4% (Naczk et al., 2011), con un promedio del 8% de arbutina respecto al peso seco (PS). Se ha referenciado que las hojas de gayuba de procedencia española carecen de metilarbutina (Font Quer, 1999), mientras que en un estudio reciente llevado a cabo por Sonnenschein & Tegtmeier (2012) en el que se analizaron preparados comerciales y muestras de plantas, precisamente los mayores contenidos en arbutina (hasta un 19% en peso seco) se encontraron en las hojas de esta procedencia. Este resultado es muy superior al referido por otros autores (8,2%) que analizaron el contenido en arbutina de plantas de gayuba de poblaciones naturales del norte de Cataluña (Parejo et al., 2001; 2002). En otro estudio realizado también en esta región se encontró que la recolección repetitiva de brotes de gayuba afecta negativamente a la producción de biomasa, por lo que un uso sostenible de estos recursos naturales implicaría la recolección en una misma población pasados dos años. Se recomienda la recolección en otoño, una vez terminado el periodo vegetativo activo, de no más del 25% de la biomasa de la planta, siendo las poblaciones con mejor recuperación las que se encuentran orientadas al sur y con menor cobertura arbórea, debido a la mayor insolación recibida (Recasens et al., 2008).

Otros constituyentes que se encuentran en la gayuba son el ácido ursólico, ácido tánico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido siríngico, galloylarbutina y hasta un 20% de galotaninos (taninos hidrolizables) así como algunos flavonoides, en particular, glicósidos de quercetina, kaempferol y miricetina (Naczk et al., 2011). En contraste con otras especies de la familia Ericaceae, la gayuba contiene menos taninos condensados (CTs), y de acuerdo con Hänsel et al. (1993), la cantidad limitada de CTs se atribuye a la enorme capacidad de la planta para sintetizar taninos hidrolizables (Naczk et al., 2011).

2. ANTECEDENTES

En un estudio previo desarrollado en la Escuela Politécnica Superior de la Universidad de Zaragoza, en el marco de un proyecto financiado por la Comunidad de Trabajo de los Pirineos que se realizó en coordinación con la Universidad Politécnica de Cataluña, se analizó el contenido en fenoles totales y la capacidad antioxidante de distintas especies medicinales (tomillo, espino albar, ortiga, entre otras) que se encuentran en el Pirineo, con el fin de evaluar su uso potencial como aditivos antioxidantes para alimentación y cosmética. En dicho estudio se encontraron en las hojas de la gayuba contenidos en fenoles totales muy superiores a los determinados en las otras especies (del orden de 10-50 veces). Se recolectaron hojas en abril, julio, y septiembre, determinándose los mayores niveles en fenoles totales en las muestras de septiembre. Dado que se encontraron así mismo diferencias significativas en los contenidos en fenoles totales de plantas muestreadas en varias poblaciones naturales (Aniés, Lanuza, Lierta, Perarrúa y Santa Cruz de la Serós,) se decidió abordar un estudio más amplio con el fin de caracterizar de forma más detallada la variabilidad fitoquímica de poblaciones naturales de gayuba distribuidas en el norte de Aragón.

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo de Fin de Grado es evaluar el potencial de poblaciones naturales de *Arctostaphylos uva-ursi* de la provincia de Huesca, como fuente de material vegetal de interés para la industria fitofarmacológica y para su uso como aditivo antioxidante en la industria cosmética y alimentaria. Asimismo, se pretende estudiar la variabilidad fitoquímica existente en dichas poblaciones, y analizar si esta variabilidad está relacionada con la altitud a la que se encuentran y el momento de la recolección.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Optimización de un protocolo para la determinación de fenoles totales mediante ensayo Folin-Ciocalteu, en extractos metanólicos obtenidos a partir de muestras de hoja seca de gayuba.
- Puesta a punto del protocolo para la determinación de arbutina en extractos metanólicos de hoja seca de gayuba mediante separación e identificación por cromatografía HPLC-UV/Vis.
- Determinación del contenido en fenoles totales y en arbutina de las hojas de 80 plantas de gayuba, recolectadas en 10 localidades del norte de Aragón.
- Estudio de los posibles efectos de factores como la localidad de origen, la altitud o la fecha de recolección en la composición en fenoles de las plantas de gayuba analizadas.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Material, reactivos y equipos

En el desarrollo de este trabajo fin de grado, además del material básico de laboratorio, como son las pipetas, probetas, matraces aforados, vasos de precipitado, tubos de ensayo y embudos de decantación, se utilizaron los siguientes equipos e instrumentos de laboratorio:

- Balanza analítica de precisión SARTORIUS CP 2245
- Balanza analítica de precisión OHAUS Pionner™
- Micropipetas de 100, 200 y 1000 µL
- Tubos de ensayo de 15 mL
- Pipeta aforada de 10 mL
- Tubos de Pyrex® de 15 mL
- Viales 4 mL
- Microjeringa para HPLC
- Cubetas de plástico de 3 mL para espectrofotometría
- Baño de ultrasonidos (Selecta)
- Espectrofotómetro UV-Vis (CARY 50 BIO, Varian)
- HPLC LaChrom MERCK HITACHI L-7400

Para el desarrollo de los diferentes métodos analíticos aplicados en este trabajo fin de grado, han sido necesarios los siguientes reactivos:

- Metanol SIGMA-ALDRICH. Chromasolv®, for HPLC ≥99,9 %
- Reactivo Folin-Ciocalteu (SIGMA-ALDRICH)
- Disolución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20%
- Arbutina (Fluka Analytical, for HPLC ≥98%)

4.2. Material vegetal

Las muestras de hoja de gayuba (5-8 brotes con 10-15 g de hojas) se recolectaron en diez poblaciones naturales (Tabla 1), nueve de la provincia de Huesca y una (Santa Eulalia de Gállego) en la provincia de Zaragoza, durante las brotaciones de primavera (marzo) y otoño (septiembre) de 2014. En cada localidad se tomaron muestras de 8 plantas. En marzo se recolectaron hojas solamente en las poblaciones de Aniés, Lierta y Perarrúa.

Tabla 1. Localización, altitud y orientación de las diez poblaciones de gayuba muestreadas en este trabajo.

Población	Latitud (N)	Longitud	Altitud (m)	Orientación
Agüero (AG)	42º 21' 32"	(W) 0º 47' 52"	738	Oeste
Aniés (AN)	42º 18' 32"	(W) 0º 34' 00"	881	Oeste
Barbastro (BA)	42º 02' 45"	(E) 0º 04' 46"	424	Este
Lierta (LI)	42º 12' 43"	(W) 0º 28' 34"	590	Oeste
Loarre (LO)	42º 20' 25"	(W) 0º 36' 48"	1401	Norte
Perarrúa (PE)	42º 16' 10"	(E) 0º 20' 44"	687	Este
Pico del Águila, Arguis (PA)	42º 18' 59"	(W) 0º 24' 42"	1410	Norte
Salto de Roldán, Nueno (SR)	42º 15' 22"	(W) 0º 23' 08"	1016	Noreste
Santa Cruz de la Serós (SC)	42º 31' 28"	(W) 0º 40' 41"	820	Sur
Santa Eulalia de Gállego (SE)	42º 17' 01"	(W) 0º 45' 44"	538	Noreste

En la Figura 8 se muestra la zona donde se recogió el material vegetal, que se corresponde con un área de unos 100 x 60 km, en los que encuentran poblaciones de gayuba en un amplio rango de altitud.



Figura 8. Localización de las poblaciones de gayuba muestreadas en este estudio.

Debido al crecimiento rastrero que tiene la gayuba, que en muchas ocasiones forma un continuo vegetal que ocupa superficies relativamente grandes, en la toma de muestras de cada población, se recogieron hojas de plantas con una separación de al menos 5 metros para asegurar que se trataba de individuos diferentes (Figura 9).



Figura 9. Plantas 7 (izquierda) y 6 (derecha) de *Arctostaphylos uva-ursi* muestreadas en la localidad de Agüero.

Las hojas de gayuba recolectadas se secaron en estufa a 60 °C durante 72 h. Una vez determinado el peso seco (PS) para cada muestra, se procedió al molido en mortero de las mismas hasta su homogenización. Las muestras molidas se conservaron en tubos cerrados a 4º C hasta su análisis.

4.3. Preparación de los extractos

Para la preparación de los extractos de hoja de gayuba, se pesaron en balanza analítica 50 mg ± 0,001 g de hoja seca molida (3 muestras por planta) y se extrajeron en un tubo de vidrio de 25 mL con 10 mL de metanol al 80% (MeOH/H₂O). Para ello, se introdujeron los tubos en un baño de ultrasonidos durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, los extractos se filtraron empleando filtros de jeringa de 0,45 µm de luz. Los extractos filtrados se conservaron en tubos de plástico de 15 mL a 4 °C hasta su análisis.

4.4. Determinación fenoles totales en extractos de hojas de gayuba

Para la determinación del contenido de fenoles totales en hojas de gayuba se utiliza el ácido gálico, un compuesto fenólico básico, como patrón para la obtención de la curva de calibrado, con la que posteriormente se calcula la concentración de fenoles totales que hay en los extractos de hojas analizados según el procedimiento de Folin-Ciocalteu, expresados como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo.

Para la obtención de la curva de calibración de ácido gálico se prepara una disolución de ácido gálico de 1000 µg/g controlada gravimétricamente, y a partir de ella se preparan los diferentes puntos de la curva de calibración de 40, 100, 160, 220, 280 y 340 µg/g, respectivamente. Todas las disoluciones se preparan en metanol.

Para la preparación y lectura de la curva de calibración, en un tubo de ensayo de vidrio ámbar de 15 mL se adicionan 0,5 mL de disolución patrón, 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu y 8 mL de agua destilada. Esta mezcla se agita manualmente durante 30 s y se introduce en un baño de ultrasonidos durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se adiciona 1 mL de carbonato sódico al 20% y se mantiene durante 30 min en oscuridad. Finalmente, se mide la absorbancia de esta disolución en el espectrofotómetro UV/Vis a 760 nm, empleando como blanco de calibrado una muestra preparada con 0,5 mL de metanol en lugar de la disolución patrón.

En la Tabla 2 se muestran las diferentes curvas de calibración obtenidas a lo largo de todo el trabajo fin de grado, para la determinación de los fenoles totales.

Tabla 2. Curvas de calibración ácido gálico para determinación de fenoles totales.

Fecha	Pendiente	Ordenada	R ²
11-mar-2015	0,0781	0,0063	0,9986
25-mar-2015	0,0763	0,0168	0,9915
07-abr-2015	0,0774	0,0231	0,9945
08-abr-2015	0,0738	0,0438	0,9977
13-abr-2015	0,0700	0,0675	0,9994
20-abr-2015	0,0707	0,0614	0,9983

Para la determinación de los fenoles totales presentes en los extractos de gayuba se ha realizado una pequeña modificación sobre el procedimiento anteriormente descrito, dado que al analizar los primeros extractos se observó un alto

contenido de fenoles totales presentes. Por lo que es necesario realizar una dilución 1/5 de los extractos para realizar la reacción, así que el procedimiento para la determinación de los fenoles totales en los extractos de gayuba consiste en la adición de 0,1 mL de extracto metanólico y 0,4 mL de metanol al 80% en un tubo de vidrio ámbar de 15 mL (dilución 1/5); a continuación se adicionan 0,5 mL de reactivo Folin-Ciocalteau y 8 mL de agua destilada. El resto del protocolo es el descrito para la recta patrón.

4.5. Determinación de arbutina en hojas de gayuba

Para la determinación del contenido de arbutina presente en las hojas de gayuba, el procedimiento a seguir ha consistido en un análisis mediante cromatografía HPLC con detector UV/Vis de los extractos metanólicos obtenidos. A partir del protocolo descrito en la American Herbal Pharmacopoeia (2008), se han realizado modificaciones para optimizar la separación cromatográfica en base a los trabajos desarrollados por Miaw-Ling & Chur-Min (2003) y Boros et al., (2014).

4.5.1. Optimización de la separación e identificación cromatográfica

Para establecer un protocolo adecuado para la determinación de arbutina en los extractos metanólicos de hoja de gayuba, en primer lugar se ha preparado una disolución madre de arbutina en metanol de concentración 1024,21 µg/g, a partir de la cual se prepararon diferentes diluciones de 20,21 µg/g, 99,77 µg/g y 200,87 µg/g. Además, con objeto de tener muestras reales que analizar, se prepararon extractos de las muestras Lierta (LI-6) y Aniés (AN-5).

Ensayo 1

Condiciones cromatográficas: fase móvil A (MeOH con 0,1% de ácido acético) y fase móvil B (H₂O con 0,1% de ácido acético). Flujo de fase móvil de 0,7 mL/min, inyección 20 µL y detección a 289 nm. En la Tabla 3 se muestra el gradiente aplicado.

Tabla 3. Modo gradiente empleado en el Ensayo 1.

Tiempo	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0 min	5	95
5 min	10	90
15 min	75	25
20 min	5	95

En estas condiciones se inyectó un punto de calibración (200,87 µg/g) para conocer el tiempo de retención de la arbutina y se inyectaron los extractos de las muestras LI-6 y AN-5, diluidos al 50% en peso con MeOH dada la alta concentración de arbutina esperada, para comprobar la ausencia de solapes con picos de otros compuestos presentes en las muestras. Los cromatogramas obtenidos para los extractos se muestran en la Figura 10.

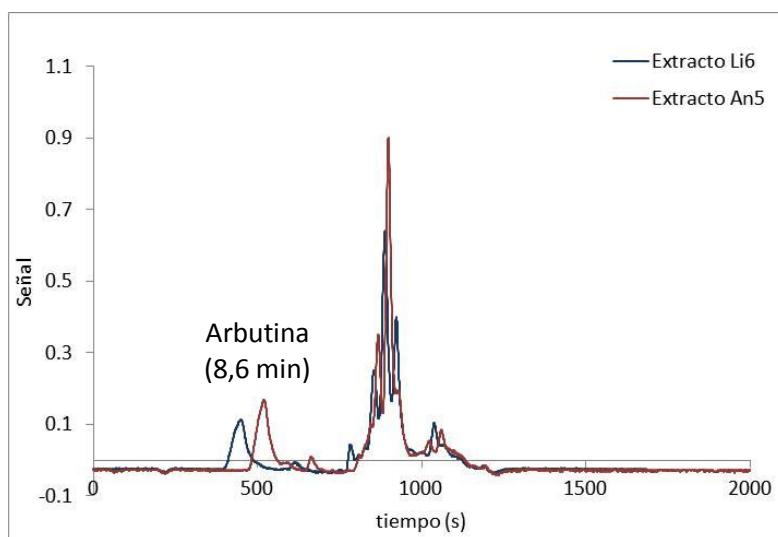


Figura 10. Cromatogramas extractos LI-6 y AN-5 inyectados en las condiciones del Ensayo 1.

Tal y como se puede observar en la Figura 10, el pico chromatográfico correspondiente a la arbutina ($tr = 8,6$ min) se separa perfectamente del resto de compuestos eluídos por la columna chromatográfica, por lo que podría utilizarse para el análisis de la misma. Pero el equipo HPLC al trabajar con una fase móvil con H_2O presentaba una presión en columna demasiado elevada, por lo que el método se descartó y se probaron nuevas condiciones chromatográficas.

Ensayo 2

Condiciones chromatográficas: fase móvil A (MeOH) y fase móvil B (H_2O). Inyección 20 µL y detección a 289 nm. En la Tabla 4 se muestra el gradiente aplicado.

Tabla 4. Modo gradiente empleado en el Ensayo 2.

Tiempo	% Fase móvil A	% Fase móvil B	Flujo
0 min	5	95	
5 min	10	90	0,7 mL/min
15 min	75	25	
15,5 min	10	90	0,5 mL/min
20 min	5	95	

En estas condiciones, se inyectaron, como en el Ensayo 1, un punto de calibración de arbutina ($200,87 \mu\text{g/g}$) y los extractos de las muestras LI-6 y AN-5. Los cromatogramas obtenidos para el patrón y la muestra LI-6 se muestran en la Figura 11.

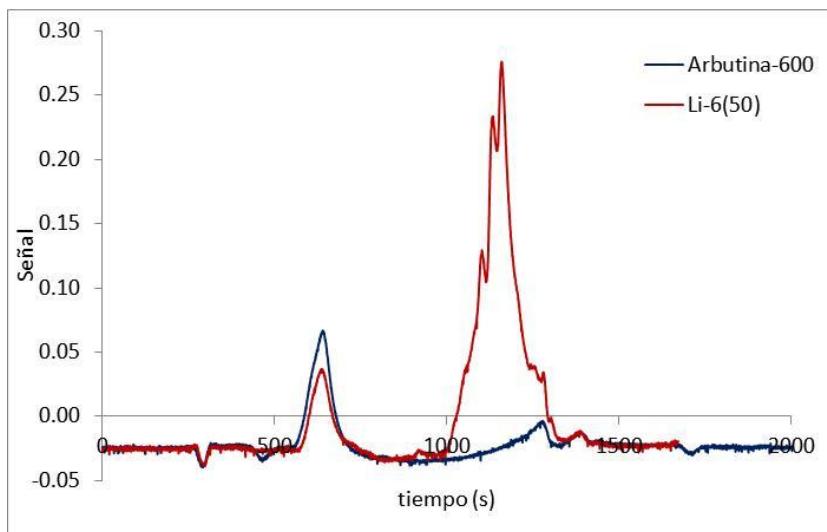


Figura 11. Cromatogramas del extracto LI-6 y del punto de calibrado de arbutina en las condiciones del Ensayo 2.

Tal y como se puede observar en la Figura 11, el pico chromatográfico correspondiente a la arbutina ($\text{tr} = 8,6 \text{ min}$) se separa perfectamente del resto de compuestos eluídos por la columna chromatográfica, por lo que podría utilizarse para el análisis de la misma. A pesar de bajar el flujo a $0,5 \text{ mL/min}$ y de no trabajar con ácido acético, la presión en columna siguió siendo demasiado elevada y nuevamente se descartaron estas condiciones.

Ensayo 3

Dadas las problemáticas encontradas, en este ensayo se decidió no utilizar agua (H_2O) como fase móvil y cambiarla por acetonaítrilo (ACN), de modo que las condiciones chromatográficas nuevas fueron: fase móvil A (MeOH) y fase móvil B (ACN). Flujo de 1 mL/min e inyección de $20 \mu\text{L}$. En la Tabla 5 se muestra el gradiente aplicado.

Tabla 5. Modo gradiente empleado en el Ensayo 3.

Tiempo	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0 min	0	100
5 min	25	75
6 min	100	0
10 min	100	0
11 min	0	100
14 min	0	100
20 min	0	100

En la separación cromatográfica del extracto de gayuba en estas condiciones, se decidió adquirir el chromatograma a tres longitudes de onda (289, 240 y 220 nm). A 289 y 240 nm no da señal la fase móvil, pero la arbutina presenta menor señal, y por tanto los extractos deben inyectarse diluidos al 50% o sin diluir, con la correspondiente carga a la columna chromatográfica del resto de componentes extraídos. A 220 nm es mucho mayor la señal de la arbutina, pero también absorbe la fase móvil. En la Figura 12 se muestra un extracto de AN-5 diluido al 50% y adquirido a tres longitudes de onda.

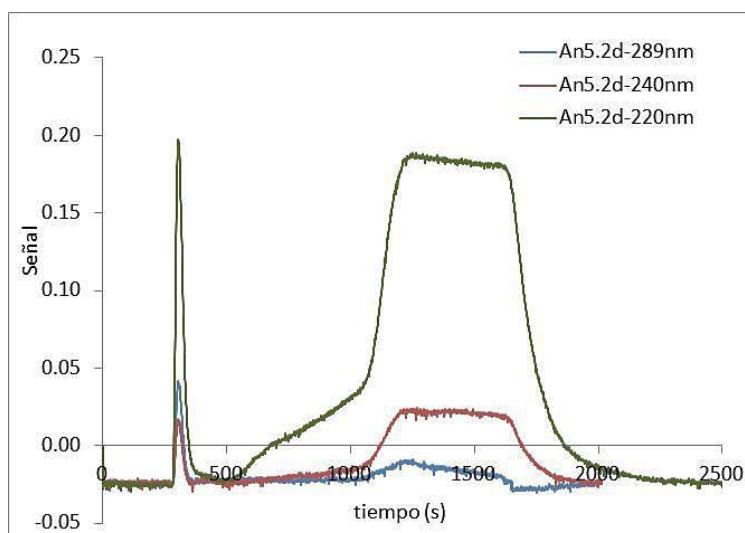


Figura 12. Cromatogramas del extracto AN-5 a 289, 240 y 220 nm en las condiciones del Ensayo 3.

Se puede observar que con esta nueva fase móvil ya no se identifican picos chromatográficos tras la separación de la arbutina, pero la señal obtenida a 289 nm y 240 nm es muy pequeña al compararla con la señal a 220 nm. Dado que el objetivo de este análisis chromatográfico sólo es identificar y cuantificar la arbutina presente en los extractos, se decide trabajar en estas condiciones chromatográficas, donde la presión de la columna permanece estable y lejos de su límite de trabajo. Además se decide registrar los chromatogramas a 220 nm, permitiendo con ello trabajar con los extractos diluidos al 10% para evitar “cargar” la columna con otros compuestos presentes. En estas condiciones de trabajo se inyectó una muestra patrón para fijar el tiempo de retención de la arbutina (Figura 13) que es de 2,6 min.

Para asegurar un buen funcionamiento del equipo chromatográfico, todos los días después de las inyecciones, se somete a una etapa de limpieza, haciendo pasar durante 5 min H₂O como fase móvil, para luego volver a trabajar con el programa fijado.

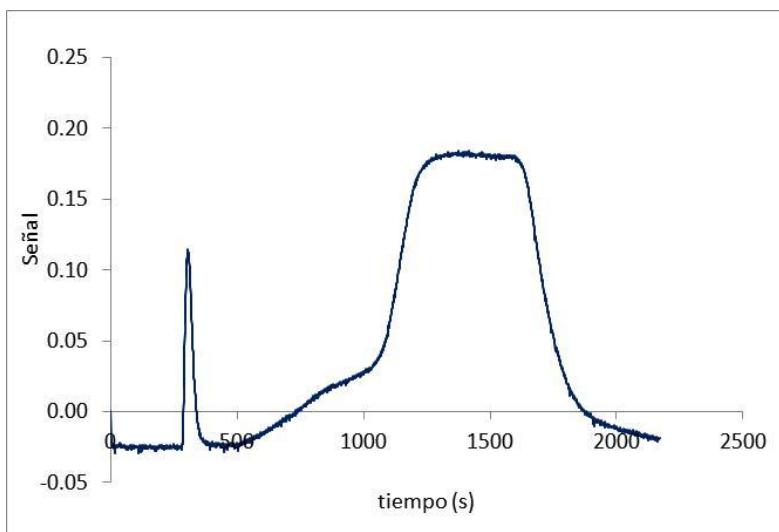


Figura 13. Cromatograma patrón de 100 µg/g en condiciones del Ensayo 3.

4.5.2. Preparación de patrones

Una vez fijadas las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de la arbutina en los extractos de gayuba, se procedió a la preparación de la curva de calibración de arbutina a partir de una “disolución madre” de concentración de 1024,21 µg/g controlada gravimétricamente. Para ello, se prepararon los diferentes puntos de la curva de calibración de 48,97; 103,00; 123,98; 161,05 y 213,51 µg/g. Todas las disoluciones se prepararon en metanol. En la Figura 14 se muestra la recta de calibrado obtenida para la cuantificación de la arbutina.

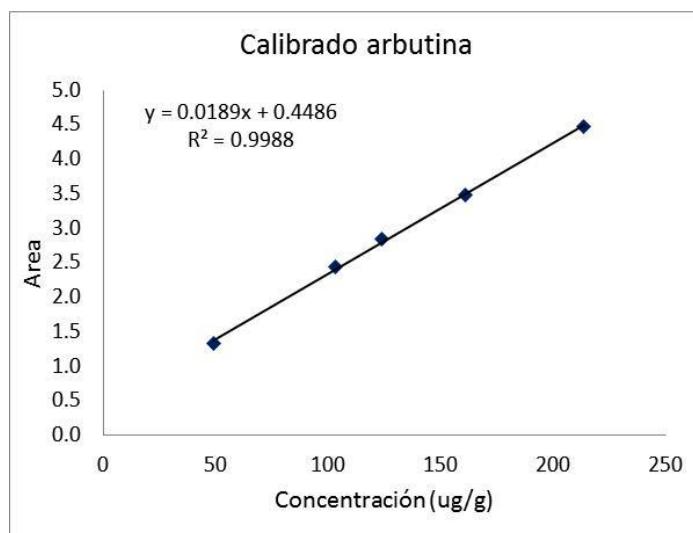


Figura 14. Recta calibrado arbutina en las condiciones cromatográficas optimizadas.

4.6.- Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones analíticas efectuadas en los extractos de hoja de gayuba se sometieron a análisis estadísticos empleando el programa SPSS 15.0 (IBM). En concreto se estudió la variación encontrada en el contenido en fenoles totales y en arbutina en las plantas de gayuba analizadas. En primer lugar se comprobó si los datos de ambas variables se ajustaban a una distribución normal teórica ($p > 0,05$), mediante el estadístico de Kolmogorov-Smirnov. También se comprobó la homogeneidad de la varianza entre poblaciones mediante el test de Levene ($p > 0,05$). Se realizaron análisis de varianza (ANOVAs) para estudiar el efecto de la población y del individuo en el contenido en fenoles totales y en arbutina de los extractos de gayuba. Para la comparación de medias de las variables cuyos datos mostraron una distribución normal y homocedasticidad, se empleó el análisis de Tukey-b, mientras que las variables sin homocedasticidad se estudiaron mediante el test T2 de Tamhane. Finalmente, se analizaron las posibles correlaciones entre la altitud y los fenoles totales, entre la altitud y la arbutina y entre los fenoles totales y la arbutina mediante el coeficiente de Pearson.

5. RESULTADOS y DISCUSIÓN

5.1.- Contenido en fenoles totales y arbutina de las hojas de gayuba recolectadas en primavera

El análisis de la varianza encontró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los contenidos de fenoles totales, expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de peso seco (mg EAG/g PS) y de arbutina (mg/g PS) de las hojas de las 24 plantas de gayuba recolectadas en marzo en Aniés, Lierta y Perarrúa. Estas diferencias se observaron tanto entre poblaciones como entre los individuos de cada población (Tabla 6). Los valores de fenoles totales no mostraron homocedasticidad (test de Levene $p = 0,033$).

Tabla 6. Contenidos en fenoles totales (mg EAG/g PS) y arbutina (mg/g PS) en hojas de 24 plantas de gayuba recolectadas en tres poblaciones naturales en marzo. Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no mostraron diferencias significativas de acuerdo al test de Tamhane (FT) o de Tukey-b (arbutina).

Población	Planta	Fenoles Totales (mg EAG/g PS)	Arbutina (mg/g PS)
Aniés	1	181,4 ± 2,9 ^a	119,9 ± 7,2 ^{ab}
	2	147,5 ± 2,5 ^{cd}	101,9 ± 6,8 ^{bc}
	3	145,1 ± 3,9 ^{bcd}	117,8 ± 28,3 ^{abc}
	4	159,6 ± 3,6 ^b	152,8 ± 5,2 ^a
	5	153,3 ± 6,9 ^{bcd}	103,8 ± 5,9 ^{bc}
	6	134,5 ± 4,2 ^e	110,1 ± 6,3 ^{abc}
	7	157,1 ± 6,2 ^{bc}	121,7 ± 19,5 ^{abc}
	8	138,5 ± 4,6 ^{de}	93,2 ± 2,5 ^c
	Promedio	152,1 ± 4,4^a	115,0 ± 10,2^{ab}
Lierta	1	131,4 ± 5,24 ^c	131,7 ± 16,1 ^{abc}
	2	136,8 ± 7,4 ^{abc}	163,1 ± 1,5 ^a
	3	154,8 ± 3,4 ^a	132,6 ± 23,4 ^{abc}
	4	149,3 ± 2,6 ^{abc}	118,0 ± 13,4 ^{abc}
	5	141,7 ± 2,0 ^{bc}	112,4 ± 2,8 ^c
	6	156,6 ± 8,2 ^{ab}	142,1 ± 7,5 ^{ab}
	7	138,5 ± 5,0 ^{bc}	122,9 ± 2,4 ^b
	8	135,6 ± 3,9 ^{bc}	118,9 ± 2,5 ^{bc}
	Promedio	143,1 ± 5,4^b	130,2 ± 8,7^a
Perarrúa	1	135,8 ± 2,8 ^c	96,1 ± 3,3 ^{bcd}
	2	99,2 ± 5,6 ^e	73,1 ± 3,7 ^d
	3	128,0 ± 2,6 ^{cd}	90,2 ± 4,8 ^{cd}
	4	146,5 ± 7,7 ^c	109,5 ± 4,9 ^a
	5	168,9 ± 3,4 ^a	110,2 ± 6,0 ^{ab}
	6	121,1 ± 2,0 ^{bd}	100,8 ± 6,1 ^{abcd}
	7	132,8 ± 4,5 ^{bc}	124,6 ± 2,5 ^{abcd}
	8	113,8 ± 6,8 ^{de}	116,7 ± 13,0 ^{abc}
	Promedio	130,8 ± 4,4^c	102,6 ± 8,4^b

En promedio, el mayor contenido en fenoles totales se determinó en las hojas muestreadas en Aniés ($152,1 \pm 4,4$ mg EAG/g PS) y el menor en las hojas de la localidad de Perarrúa ($130,8 \pm 4,4$ mg EAG/g PS). Sin embargo, el mayor contenido medio en arbutina se encontró en las hojas de las plantas de Lierta ($130,2 \pm 8,7$ mg/g PS), aunque no se encontraron diferencias significativas con las hojas muestreadas en la población de Aniés. Las hojas recolectadas en Perarrúa mostraron así mismo el menor contenido promedio en arbutina (Tabla 6). El rango de variación observado fue más amplio cuando se compararon los niveles de fenoles totales y de arbutina de cada planta muestreada, puesto que se determinaron contenidos medios en fenoles totales de $99,2 \pm 5,6$ mg EAG/g PS en el individuo PE-2 frente a los $181,4 \pm 2,9$ mg EAG/g PS del individuo AN-1, y un contenido en arbutina de $73,1 \pm 3,7$ mg/g PS en ese mismo individuo PE-2, frente a los $163,1 \pm 1,5$ mg EAG/g PS de la planta LI-2. Entre las plantas de una misma población se observaron variaciones del orden del 30-40% (Tabla 6). Cuando se analizó la correlación entre el contenido en fenoles totales y en arbutina de las 24 plantas estudiadas se estimó un coeficiente de Pearson de 0,386 ($p = 0,063$), en el límite de significación aunque, en cualquier caso, se trataría de una correlación baja. Así mismo, no se encontró correlación significativa entre el contenido en fenoles totales y arbutina y la altitud a la que crece la planta, estimándose un coeficiente de Pearson de 0,280 ($p = 0,184$) y de -0,199 ($p = 0,351$), respectivamente.

5.2. Contenido en fenoles totales y arbutina de las hojas de gayuba recolectadas en otoño

En el muestreo realizado en otoño se amplió el número de localidades a diez con el fin de cubrir un rango de altitud geográfica más amplio. Como ocurrió en el muestreo de marzo, el ANOVA detectó diferencias significativas entre los contenidos medios en fenoles totales y en arbutina de las poblaciones estudiadas ($p < 0,001$). Debido a ello, se procedió a realizar las comparaciones entre individuos para cada población por separado.

En la Tabla 7 se recogen los contenidos en fenoles totales determinados en las 80 plantas de gayuba analizadas.

Se encontró una amplia variación entre las mismas, ya que en las hojas del individuo LI-4 el contenido en fenoles totales fue de $103,3 \pm 4,8$ mg EAG/g PS, mientras que en la planta SR-2 se determinó un contenido de $206,4 \pm 6,5$ mg EAG/g PS. Como resultado de esta variabilidad, en las hojas recogidas en Lierta se encontraron en promedio niveles de fenoles totales significativamente inferiores a los de hojas recolectadas en plantas de Agüero, Loarre, Perarrúa, Salto de Roldán, Santa Cruz de la Serós y Santa Eulalia de Gállego. En promedio, los mayores niveles de fenoles totales se determinaron en las poblaciones de Loarre, Salto de Roldán y Santa Eulalia de Gállego, aunque estos contenidos solo difirieron significativamente de los estimados en muestras de Barbastro y Lierta (Tabla 7). Estas diferencias se mantuvieron entre plantas muestreadas en la misma localidad, ya que por ejemplo en el individuo AN-6 se encontró un nivel de fenoles totales de $114,0 \pm 4,1$ mg EAG/g PS mientras que en el individuo AN-1 el contenido en fenoles totales fue de $175,9 \pm 3,8$ mg EAG/g PS.

Tabla 7. Fenoles totales (mg EAG/g PS) en hojas de 80 plantas gayuba recolectadas en 10 poblaciones en septiembre. Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no mostraron diferencias significativas de acuerdo al test de Tamhane.

Población	Planta	Fenoles Totales (mg EAG/g PS)	Población	Planta	Fenoles Totales (mg EAG/g PS)
Agüero	1	180,3 ± 10,5 ^{ab}	Perarrúa	1	166,3 ± 19,5 ^{abcd}
	2	140,2 ± 5,9 ^{cd}		2	155,0 ± 10,5 ^{bcd}
	3	183,0 ± 8,4 ^a		3	177,5 ± 5,0 ^{ab}
	4	198,5 ± 5,1 ^a		4	163,0 ± 9,6 ^{abc}
	5	159,7 ± 3,9 ^{bc}		5	188,3 ± 6,6 ^a
	6	161,1 ± 6,0 ^{bc}		6	165,7 ± 8,9 ^{abc}
	7	130,7 ± 7,9 ^d		7	148,0 ± 9,1 ^{cd}
	8	144,3 ± 6,9 ^{cd}		8	129,6 ± 7,3 ^d
	Promedio	162,2 ± 23,3^{ab}		Promedio	162,5 ± 19,7^{ab}
Aniés	1	175,9 ± 3,8 ^a	Pico del Águila	1	141,8 ± 4,0 ^d
	2	140,1 ± 2,9 ^c		2	163,7 ± 6,7 ^{abcd}
	3	150,8 ± 1,7 ^{bc}		3	140,2 ± 5,6 ^d
	4	164,3 ± 2,6 ^{ab}		4	145,4 ± 1,2 ^{cd}
	5	151,4 ± 2,2 ^{bc}		5	165,1 ± 6,2 ^{ab}
	6	114,0 ± 4,1 ^d		6	184,3 ± 8,2 ^a
	7	148,6 ± 2,3 ^c		7	160,5 ± 5,0 ^a
	8	155,5 ± 1,1 ^{bc}		8	137,2 ± 3,6 ^d
	Promedio	153,6 ± 19,9^{abc}		Promedio	154,1 ± 15,2^{abc}
Barbastro	1	153,9 ± 9,1 ^{ab}	Salto de Roldán	1	197,4 ± 11,2 ^{ab}
	2	154,1 ± 7,1 ^{ab}		2	206,4 ± 6,5 ^a
	3	134,9 ± 5,8 ^b		3	167,6 ± 6,1 ^b
	4	145,8 ± 4,6 ^{ab}		4	185,7 ± 8,0 ^{ab}
	5	159,7 ± 0,4 ^a		5	152,5 ± 6,1 ^{abcd}
	6	143,5 ± 9,1 ^{ab}		6	137,4 ± 6,2 ^d
	7	115,1 ± 5,6 ^c		7	183,4 ± 15,4 ^{cd}
	8	151,9 ± 2,3 ^b		8	139,0 ± 3,4 ^{cd}
	Promedio	144,8 ± 14,5^{bc}		Promedio	171,2 ± 26,1^a
Lierta	1	123,3 ± 7,0 ^b	Santa Cruz de la Serós	1	161,9 ± 15,0 ^{abcd}
	2	126,3 ± 11,2 ^{abcd}		2	140,0 ± 6,1 ^d
	3	106,9 ± 10,3 ^{abcd}		3	172,5 ± 8,7 ^c
	4	103,3 ± 4,8 ^d		4	172,4 ± 5,5 ^{ab}
	5	186,9 ± 7,4 ^a		5	176,0 ± 6,8 ^{ab}
	6	161,2 ± 5,0 ^c		6	147,5 ± 3,3 ^{cd}
	7	170,4 ± 7,9 ^{ac}		7	157,0 ± 7,4 ^{abcd}
	8	160,5 ± 5,9 ^c		8	168,4 ± 5,1 ^a
	Promedio	142,3 ± 21,7^c		Promedio	161,9 ± 14,0^{ab}
Loarre	1	160,1 ± 1,0 ^c	Santa Eulalia de Gállego	1	178,2 ± 8,2 ^{abcd}
	2	156,9 ± 4,9 ^{cd}		2	167,2 ± 2,2 ^{bc}
	3	162,7 ± 3,8 ^{cd}		3	195,5 ± 10,8 ^a
	4	168,1 ± 3,1 ^{bc}		4	149,1 ± 8,4 ^{cd}
	5	173,7 ± 5,9 ^{abcd}		5	160,4 ± 13,7 ^{abcd}
	6	140,7 ± 4,7 ^d		6	156,2 ± 6,0 ^{cd}
	7	196,4 ± 9,8 ^{ab}		7	144,7 ± 2,5 ^d
	8	194,7 ± 2,9 ^a		8	174,1 ± 3,3 ^{ab}
	Promedio	169,2 ± 18,6^a		Promedio	165,7 ± 17,3^a

Estos contenidos en fenoles totales son similares a los referidos (Chen et al., 2008) en extractos acuosos de otras especies de conocido potencial antioxidante que se emplean en la industria agroalimentaria como el romero (185 mg EAG/g PS), el té (149,3 mg EAG/g PS) o la guayaba (154,4 mg EAG/g PS). Por lo tanto, nuestros resultados confirmarían el potencial de esta especie como aditivo antioxidante.

Respecto a los contenidos en arbutina de las hojas de gayuba recolectadas en las 10 poblaciones, se encontró un amplio rango de variación, entre $92,0 \pm 3,0$ mg/g PS en el individuo AN-6 y $194,2 \pm 5,6$ mg/g PS en el individuo SE-8 (Tabla 8). Esta variabilidad se detectó así mismo entre plantas de una misma población, ya que por ejemplo en el individuo LO-2 se determinó un contenido en arbutina de $192,6 \pm 5,7$ mg/g PS, mientras que en el LO-6 este contenido fue significativamente inferior, de $106,9 \pm 5,2$ mg/g PS.

Cuando se compararon los resultados obtenidos en promedio para cada población (Tabla 8), se observó que en las hojas recogidas en Aniés y en Barbastro se determinaron contenidos en arbutina significativamente inferiores ($113,8 \pm 14,9$ y $124,4 \pm 17,1$ mg/g PS, respectivamente) a los encontrados en los extractos de hojas recolectadas en las demás poblaciones (promedio $150,1 \pm 21,3$ mg/g PS).

Estos resultados coinciden con el rango de variación para la arbutina encontrado en hojas de gayuba que se ha descrito en trabajos anteriores (ver referencias en American Herbal Pharmacopoeia, 2008) aunque, el promedio obtenido fue superior ($143,9 \pm 24,1$ mg/g PS) al 6-9% referido por Parejo et al., (2001; 2002) en el único estudio realizado en poblaciones naturales españolas. Nuestros datos coinciden con los del estudio de Sonnenschein & Tegtmeier (2012), quienes refirieron porcentajes de arbutina respecto a peso seco de hasta el 19% en hojas de gayubas españolas.

Tabla 8. Contenido en arbutina (mg/g PS) en hojas de 80 plantas de gayuba recolectadas en 10 poblaciones en septiembre. Entre poblaciones y para cada población, valores seguidos de la misma letra no mostraron diferencias significativas de acuerdo al test de Tamhane.

Población	Planta	Arbutina (mg/g PS)	Población	Planta	Arbutina (mg/g PS)
Agüero	1	153,2 ± 19,6 ^{ab}	Perarrúa	1	127,5 ± 2,6 ^{ad}
	2	127,7 ± 11,5 ^{ab}		2	135,3 ± 3,4 ^a
	3	152,3 ± 8,9 ^{ab}		3	122,3 ± 4,8 ^d
	4	138,2 ± 2,0 ^b		4	159,6 ± 3,4 ^b
	5	156,1 ± 3,8 ^a		5	164,8 ± 7,1 ^b
	6	147,5 ± 2,0 ^a		6	146,7 ± 1,9 ^c
	7	154,5 ± 24,5 ^{ab}		7	163,8 ± 7,7 ^b
	8	139,7 ± 14,7 ^{ab}		8	130,7 ± 10,1 ^{acd}
	Promedio	147,5 ± 11,7^a		Promedio	143,8 ± 17,2^a
Aniés	1	134,5 ± 22,8 ^{ab}	Pico del Águila	1	170,9 ± 2,8 ^a
	2	112,0 ± 2,1 ^{ab}		2	190,4 ± 19,2 ^{ab}
	3	99,0 ± 4,8 ^b		3	155,7 ± 16,8 ^{ab}
	4	118,3 ± 16,6 ^{ab}		4	142,0 ± 4,6 ^{ab}
	5	119,8 ± 4,9 ^a		5	145,1 ± 11,4 ^{ab}
	6	92,0 ± 3,0 ^{ab}		6	141,0 ± 18,7 ^{ab}
	7	104,0 ± 3,2 ^b		7	146,3 ± 1,4 ^b
	8	130,6 ± 11,7 ^{ab}		8	174,6 ± 12,2 ^{ab}
	Promedio	113,8 ± 14,9^b		Promedio	158,3 ± 18,3^a
Barbastro	1	134,1 ± 3,6 ^a	Salto de Roldán	1	141,5 ± 6,8 ^{bc}
	2	140,0 ± 1,3 ^a		2	163,0 ± 8,6 ^{ab}
	3	106,8 ± 5,4 ^d		3	137,1 ± 4,3 ^c
	4	142,1 ± 3,7 ^a		4	167,9 ± 14,8 ^{abc}
	5	135,8 ± 6,9 ^{abcd}		5	141,9 ± 7,8 ^{abc}
	6	111,4 ± 3,6 ^{bcd}		6	132,5 ± 9,4 ^c
	7	96,4 ± 7,2 ^d		7	162,1 ± 3,9 ^a
	8	126,1 ± 6,8 ^{abc}		8	150,6 ± 21,4 ^{abc}
	Promedio	124,1 ± 17,1^b		Promedio	149,6 ± 13,3^a
Lierta	1	119,6 ± 8,2 ^d	Santa Cruz de la Serós	1	170,6 ± 22,2 ^{abc}
	2	123,6 ± 12,5 ^{cd}		2	134,4 ± 1,9 ^c
	3	150,7 ± 12,7 ^{bcd}		3	128,9 ± 2,4 ^c
	4	144,8 ± 10,1 ^{bcd}		4	150,6 ± 0,7 ^{ab}
	5	158,5 ± 15,5 ^{abcd}		5	171,1 ± 4,5 ^a
	6	166,4 ± 7,2 ^{ab}		6	122,8 ± 5,8 ^c
	7	185,7 ± 11,0 ^a		7	145,7 ± 17,6 ^{abc}
	8	143,0 ± 3,8 ^c		8	137,4 ± 8,5 ^{bc}
	Promedio	149,0 ± 21,7^a		Promedio	145,2 ± 18,1^a
Loarre	1	180,4 ± 2,3 ^a	Santa Eulalia de Gállego	1	149,5 ± 1,0 ^{abcd}
	2	192,6 ± 5,7 ^a		2	130,9 ± 7,2 ^d
	3	145,5 ± 16,5 ^{ab}		3	125,9 ± 14,9 ^d
	4	165,6 ± 17,1 ^{ab}		4	169,1 ± 11,9 ^{ab}
	5	140,3 ± 24,6 ^{ab}		5	148,3 ± 2,6 ^{bd}
	6	106,9 ± 5,2 ^c		6	131,4 ± 3,0 ^{cd}
	7	133,4 ± 4,3 ^c		7	163,4 ± 19,8 ^{abcd}
	8	184,5 ± 19,9 ^{ab}		8	194,2 ± 5,6 ^a
	Promedio	156,1 ± 29,6^a		Promedio	151,6 ± 23,2^a

La amplia variabilidad encontrada entre las 80 plantas de gayuba analizadas se tradujo por tanto, en que no se encontró un patrón de acumulación de compuestos fenólicos asociado a la procedencia del material vegetal recolectado (Figura 15).

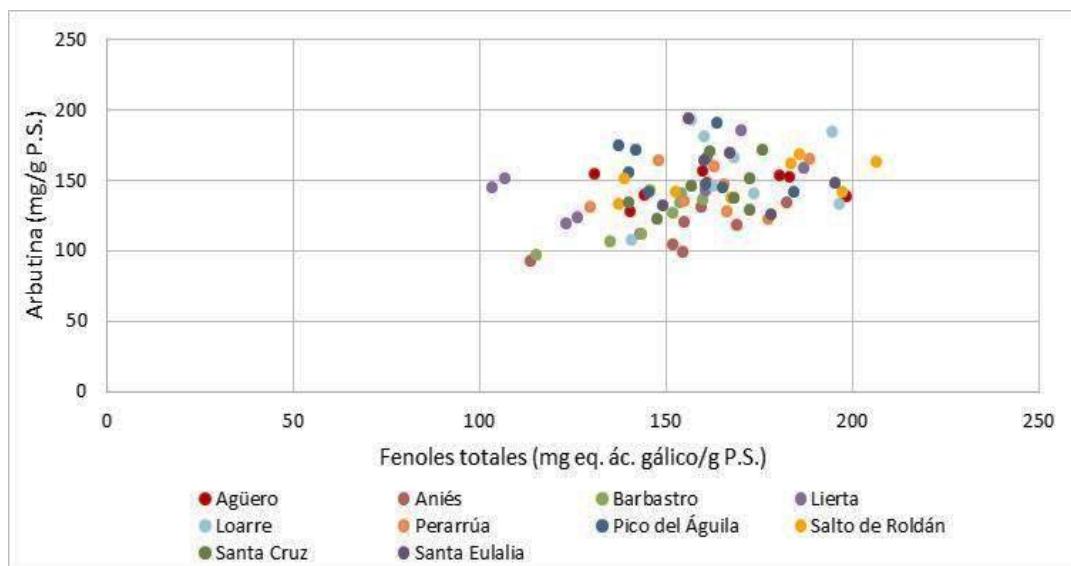


Figura 15. Variabilidad encontrada para el contenido en fenoles totales (mg EAG/g PS) y en arbutina (mg/g PS) en los extractos de hojas recolectadas en otoño de ochenta plantas de gayuba.

Las plantas, recolectadas en septiembre, que acumularon en sus hojas mayores contenidos en fenoles totales mostraron también contenidos superiores en arbutina, aunque la correlación observada entre ambas variables fue baja: se estimó un coeficiente de Pearson de 0,326 ($p = 0,003$). Por otro lado, la altitud no afectó al contenido en fenoles totales, aunque sí se encontró una baja correlación entre este factor y el contenido en arbutina de las hojas, con un coeficiente de Pearson de 0,277 ($p = 0,013$). Esto podría indicar un papel de la arbutina en la defensa de la planta frente a niveles mayores de radiación ultravioleta, aunque sería necesario desarrollar un estudio más amplio para confirmar dicha hipótesis. Este tipo de estudios fue abordado por Monschein et al. (2010) quienes refirieron una mayor acumulación de flavonoides en poblaciones de mayor altitud de otra Ericácea, *Calluna vulgaris*. Entre los flavonoides, que son los compuestos que mayoritariamente absorben la radiación ultravioleta perjudicial, los flavonoles son probablemente los compuestos que tienen actividad antioxidante en planta (Hernández et al., 2009).

Respecto a la variación observada en la acumulación de fenoles totales y de arbutina en hojas de plantas de gayuba recolectadas en primavera o en otoño, nuestros resultados coinciden con los descritos en la bibliografía, ya que el ANOVA

mostró que en promedio los extractos de gayuba de hojas recolectadas en septiembre en Aniés, Lierta y Perarrúa contenían, en promedio, mayor cantidad de fenoles totales.

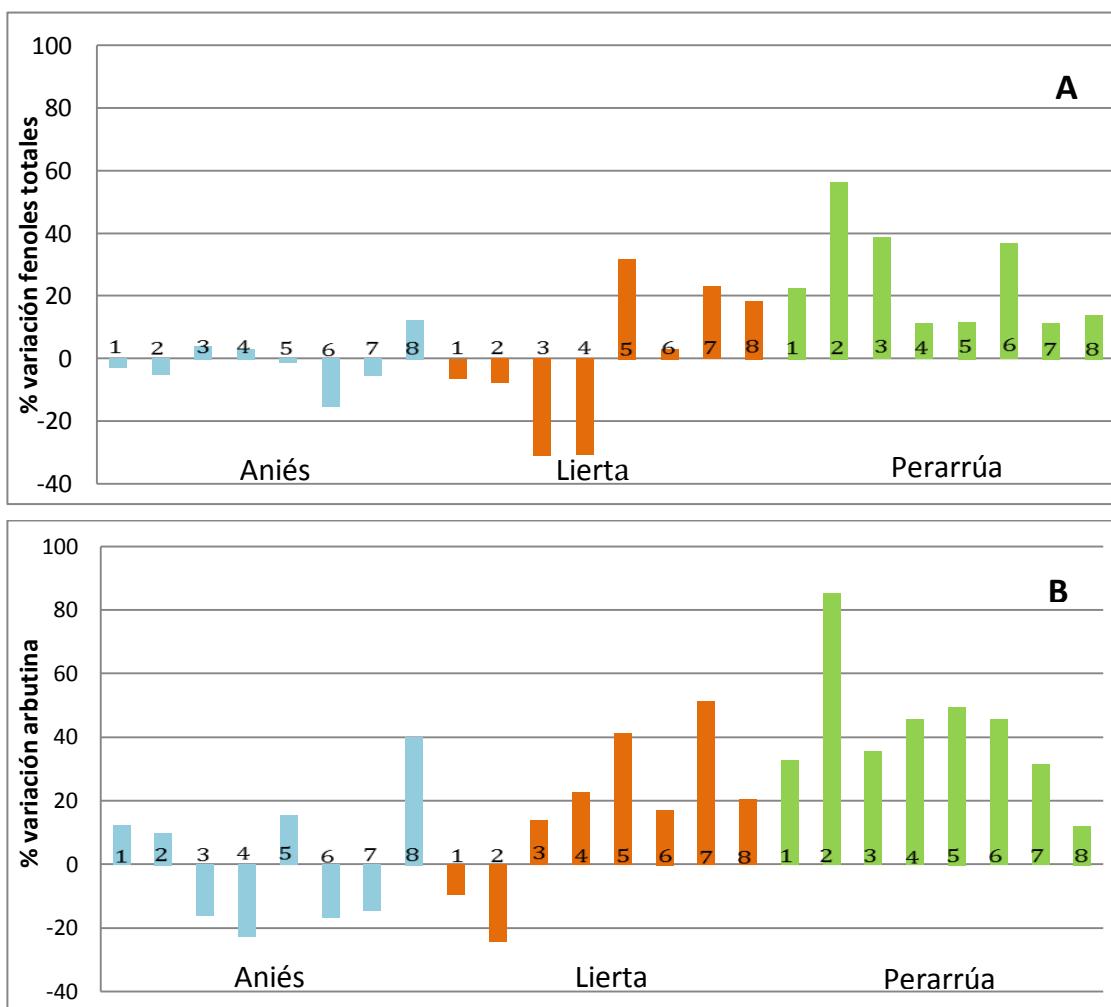


Figura 16. Variación estacional del contenido de fenoles totales (mg EAG/g PS) (A) y de arbutina (mg/g PS) (B) en las hojas de 24 plantas de gayuba recolectadas en marzo y septiembre de 2014.

Sin embargo, se encontró así mismo una interacción significativa entre la fecha de recolección y la localidad (Figura 16), ya que en las hojas muestreadas en Aniés se determinaron en las dos fechas niveles similares de fenoles totales (152,1 mg EAG/g PS en marzo frente a 153,6 mg EAG/g PS en septiembre) y de arbutina (en marzo 114,1 mg/g PS frente a 113,8 mg/g PS en septiembre). En Lierta se incrementó en septiembre el contenido en arbutina (149,0 mg/g PS frente a 130,2 mg/g PS) pero no el de fenoles totales (142,4 mg EAG/g PS frente a 143,1 mg EAG/g PS). En Perarrúa se incrementaron en septiembre los contenidos de arbutina (143,8 mg/g PS frente a 103,2 mg/g PS) y de fenoles totales (162,5 mg EAG/g PS frente a 130,8 mg EAG/g PS). Esta variabilidad se corroboró cuando se analizaron los comportamientos de cada

planta, como se observa en la Figura 16. Únicamente, en Perarrúa todos los individuos mostraron mayores contenidos de fenoles totales y arbutina en septiembre que en marzo. Este incremento podría explicarse por la localización más septentrional de esta población, en Prepirineo, con mayores fluctuaciones estacionales.

6. CONCLUSIONES

- Se ha puesto a punto un protocolo para la determinación del contenido de fenoles totales en extractos metanólicos obtenidos de hojas secas de gayuba mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.
- Se ha puesto a punto un protocolo para la determinación del contenido de arbutina en extractos metanólicos obtenidos de hojas secas de gayuba, mediante separación e identificación por cromatografía HPLC con un detector UV-Vis. Las condiciones cromatográficas óptimas de trabajo requieren un gradiente de fase móvil de acetonitrilo y metanol, con detección a 220 nm.
- Se han determinado niveles de fenoles totales y de arbutina en hojas de gayuba recolectadas en marzo y en septiembre en poblaciones naturales del norte de Aragón, siendo superior el contenido de las hojas recogidas en septiembre, aunque esto varió en función de la población y la planta estudiada.
- Se encontró una gran variabilidad en el contenido de fenoles totales y en el contenido de arbutina entre las plantas, incluso en aquellas pertenecientes a la misma población, tanto en las poblaciones muestreadas en el mes de marzo como en el mes de septiembre.
- En el muestreo más amplio, realizado en septiembre, las hojas de las poblaciones de Barbastro y Lierta en promedio acumularon significativamente menos fenoles totales que las de Loarre, Salto del Roldán y Santa Eulalia de Gállego,
- Las plantas de Aniés y Barbastro mostraron en promedio contenidos en arbutina significativamente inferiores a las de las restantes poblaciones.
- A pesar de estas diferencias significativas entre poblaciones, no se encontró un patrón de variación asociado a la procedencia del material vegetal de gayuba.
- La altitud no afectó al contenido de fenoles totales, ni al contenido de arbutina en marzo, sin embargo se encontró una baja correlación entre la altitud y el contenido en arbutina de las hojas de gayuba recolectadas en septiembre.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Absolom, D.R. 1988. The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 287-298.
- Alam, P., Alqasoumi, S., Shakeel, F. & Abdel-Kader, M. 2011. HPTLC densitometry analysis of arbutin in bulk drug and methanolic extracts of *Arctostaphylos uva-ursi*. *Natural Products Research* 25: 1671-1675.
- Amarowicz, R. Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P. Barl, B. & Weil, J.A. 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* 84: 551–562.
- Amarowicz, R. & Pegg, RB. 2013. Inhibition of proliferation of human carcinoma cell lines by phenolic compound from a bearberry-leaf crude extract and its fraction. *Journal of Functional Foods*, 5:660–667.
- American Herbal Pharmacopoeia. 2008. Uva Ursi Leaf. *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. Standards of Analysis, Quality Control and Therapeutics.
- Andersson, A., Granum, P.E. & Ronner, U. 1998. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *International Journal of Food Microbiology* 39: 93–99.
- Anuuk, H., Hirno, S., Türi, E., Mikelsaa, M., Arak, E. & Wadsturom, T. 1999. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* strains to medicinal plant extracts. *FEMS Microbiology Letters* 172: 41–45.
- Badía, D. 2001. Els arbres i arbusts del Vedat de Fraga. *Institut d'estudis del Baix Cinca, Fraga*
- Baudière, A. & Fromard, F. 1988. Estudio experimental de la regeneración del pino en los matorrales de gayuba [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel] del bosque de Barrès (Pirineos Orientales, Francia). *Instituto de Estudios Altoaragoneses C.S.I.C, Jaca*.
- Boros, B., Jakabová, S., Madarász, T., Molnár, R., Galambosi, B., Kilár, F., Felinger, A. & Farkas, A. 2014. Validated HPLC method for simultaneous quantitation of bergenin, arbutin and gallic acid in leaves of different *Bergenia* species. *Chromatographia* 1129-1135
- Brewer, M.S. 2011. Natural Antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10: 221-247.

- Burke, A., Catalano, P., Lal, S. K., Maniam, P. & Tojino, C. 2014 Uva Ursi. *Augusta Health Specialists.*
- Cabeza, J.P. & Alonso, J.L. 2014. *Guía imprescindible de las flores del Prepirineo y tierras vecinas*, 3.
- Calvo, L., Tárrega, R. & De Luis, E. 2002. The dynamics of Mediterranean shrubs species over 12 years following perturbations. *Plant Ecology* 160: 25-42.
- Castroviejo, S & Valdés Bermejo, E. 1993. Flora ibérica. *Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Ericaceae* 4.
- Chen, H.Y., Lin, Y.C. & Hsieh, C.L. 2008. Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry* 104: 1418-1424.
- Craighead, J., Craighead, F. & Davis, R. 1963. A Field Guide to Rocky Mountain Wildflowers. Ed. *The Riverside Press*, Boston.
- Del Barrio, J., Luis-Calabuig, E. & Tárrega, R. 1999. Vegetative response of *Arctostaphylos uva-ursi* to experimental cutting and Burning. *Plant Ecology* 145: 191–195.
- Diggs, G. 1995. *Ericaceae* subfamily *Vaccinioideae* PP: *Arctostaphylos* Adanson. In: Luteyn J.L., Clemants S., Diggs G., Dorr L., Judd W., Sørensen P., Stevens P., Wallace G. *Botanical Gardens*.
- Dykes, G.A., Amarowicz, R. & Pegg, R.B. 2003. An antioxidant bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) extract modulates surfaces hydrophobicity of a wide range of food-related bacteria: Implications for functional food safety. *Food Control* 515-118.
- Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. 2014. Disponible en <https://botplusweb.portalfarma.com> [Consultado: 15-10-15]
- Font Quer, P. 1999. Plantas medicinales. *El Dioscórides renovado. Península*.
- Frohne, D. 1970. Untersuchungen zur Frage der Harndesinfizierenden Wirkungen von Barentraubenblatt-Extrakten. *Planta Medica* 18: 1-25.
- Gómez García, D. 2005. Atlas de la Flora de Aragón. *Departamento de Medio Ambiente del Gobierno de Aragón e Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC)*.
- Gracia, M., Montane, F., Pique, J., Retana, J. 2007. Overstory structure and topographic gradients determining diversity and abundance of understory shrub species in temperate forests in central Pyrenees (NE Spain). *Forest Ecology and Management* 242: 391-397.

- Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H. & Schneider, G. 1993. In Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. *Springer-Verlag* 4: 330–336.
- Hänsel, R., Sticher, O. & Steinegger, E. 1999. Pharmakognosie-phytopharmazie. *Springer-Verlag*.
- Hernández, A. 2008. Gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*) “La planta eficaz para combatir infecciones de orina”. *Rehalsa* 7:63-67.
- Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegem, F. & Munné-Bosch, S. 2009. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science* 14: 125-132.
- Jimenez, P. & Girbés, T. 2012. Determinación del contenido total de polifenoles en alimentos con el reactivo de Folin-Ciocalteau. Nutrición y Bromatología; Facultad de Medicina; Universidad de Valladolid.
- Karre, L., Lopez, K. & Getty, K. J. 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. *Meat science* 94: 220-227.
- Khoddami, A., Wilkes M. & Roberts T. 2013. Techniques for analysis of plants phenolic compounds. *Molecules* 18: 2328-2375.
- Krpata, D., Muhlmann, O., Kuhnert, R., Ladurner, H., Gobl, F. & Peintner, U. 2007. High diversity of ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos uva-ursi* in subalpine and alpine zones: potential inoculum for afforestation. *Forest Ecology and Management* 250: 167-175.
- Lamien-Meda, A., Lukas, B., Schmiderer, C., Franz, C. & Novak, J. 2009. Validation of a quantitative assay of arbutin using gas chromatography in *Origanum majorana* and *Arctostaphylos uva-ursi* extracts. *Phytochemical Analysis* 20: 416-420.
- Leopoldini, M., Russo, N. & Toscano, M. 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 125: 288-306.
- Luis, E., Tárrega, R. & Calvo, L. 1989. Biomass and biomass regeneration after disturbances in shrub communities in León province, NW Spain. In: Biomass for Energy and Industry. Elsevier Applied Science. Londres-Nueva York, 1114–1120.
- MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Ficha Gayuba. Recuperada 15-10-2015
- Miaw-Ling, C. & Chur-Min, C. 2003. Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agent in cosmetic product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33: 617-626.

- Monschein, M., Iglesias, J., Kunert, O. & Bucar, F. 2010. Phytochemistry of heather (*Calluna vulgaris* L. Hull) and its altitudinal alteration. *Phytochemistry Reviews* 9: 205-215.
- Morillas-Ruiz, J.M. & Delgado-Alarcón, J.M. 2012. Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria* 32: 8-20.
- Naczk, M., Pegg, RB., & Amarowicz, R. 2011. Protein-precipitating capacity of bearberry-leaf (*Arctostaphylos uva-ursi* L. Sprengel) polyphenolics. *Food Chemistry* 124: 1507-1513.
- Olennikov, D.N. & Nazarova, A.V. 2013. Galloylpicein and other phenolic compounds from *Arctostaphylos uva-ursi*. *Chemistry of Natural Compounds* 49: 1-7.
- Packer, J.G. & Denford, K.E. 1974. A contribution to the taxonomy of *Arctostaphylos uva-ursi*. *Canadian Journal of Botany* 52: 745-753.
- Panusa, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Multari, G., & Romana-Gallo, F. 2015. HPLC-PDAESI-TOF/MS metabolic profiling of *Arctostaphylos pungens* and *Arctostaphylos uva-ursi*: A comparative study of phenolic compounds from leaf metabolic extract. *Phytochemistry* 115: 79–88.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. 2001 A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by High-Performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis* 12: 336-339.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. 2002 Variation of the arbutin content in different wild populations of *Arctostaphylos uva-ursi* in Catalonia, Spain. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 9: 329-333.
- Recasens, J., Ninot, P., Cristóbal, R & Aymerich, P. 2008. Sustainable Wild Harvesting of *Arctostaphylos uva-ursi* in the Pyrenees as a Conservartion Practice. *Journal of Herbs, Spices & Medical Plants* 14:1-12.
- Renobales, G. & Sallés, J. 2001. Plantas de interés farmacéutico. *Universidad del País Vasco UPV/EHU. Facultad de Farmacia*.
- Rychlińska, I. & Nowak, S. 2012. Quantitative determination of arbutine and hydroquinone in difrent plant materials by HPLC. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 40:109-113.
- Salemaa, M., Vanha-Majamaa, I., & Gardner, P. J. (1999). Compensatory growth of two clonal dwarf shrubs, *Arctostaphylos uva-ursi* and *Vaccinium uliginosum* in a heavy metal polluted environment. *Plant Ecology*, 141:79-91.

- Seigler, D. 1998. Plant Secondary metabolism. Editorial Kluwer, Dordrecht, Holanda.
- Seo, D.H., Jung, J.H., Lee, J.E., Jeon, E.J., Kim, W. & Park C.S. 2012 Biotechnological production of arbutins (α - and β -arbutins), skin-lightening agents, and their derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95: 1417-1425.
- Shah, M.A.; Don Bosco, S.J. & Mir, S.A. 2014. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science* 98: 21–33.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M. & Corke, H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 7749-7759.
- Sonnenschein, M. & Tegtmeier, M. 2012. Experiments on the domestication of bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng). *Journal of Medicinal and Spice Plants* 17: 124-128.
- Svanberg, M., Westergren, G., & Olsson, J. 1984. Oral implantation in humans of *Streptococcus mutans* with different degrees of hydrophobicity. *Infection and Immunity* 43: 817–821.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. Edición en castellano de la *Universitat Jaume I*. Vol 1.
- Türi, E., Türi, M., Anuuk, H. & Arak, E. 1999. Action of aqueous extracts of bearberry and cowberry leaves and wild camomile and pineapple-weed flowers on *Escherichia coli* surface structures. *Pharmaceutical Biology* 37: 127–133.
- Valladares, S. 1994. Espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta visible. Control de calidad de insumos y dietas acuícolas. *Departamento de Pesca. Food and Agriculture Organization of the United Nation*.
- Wells, P.V. 1988. New combinations in *Arctostaphylos* (Ericaceae): annotated list of changes in status. *Madroño* 35:330-41.